

仕 様 書

1. 業 務 名 クロマツ抵抗性個体群における RNA-Seq 解析業務 1 式
2. 業務概要 次世代シーケンサ (イルミナ社 Novaseq6000) を用いてクロマツ抵抗性個体群 48 個体について各 2 タイムポイントより取得したサンプルについて RNA-seq 解析を行う。
3. 作業内容 対象樹種 : クロマツ
提供サンプル : total RNA
サンプル数 : 48 個体×2 タイムポイント 計 96 検体

I. 品質検査

下記項目にて、受け入れ RNA の品質検定を行うこと。

- (1) Nanodrop (分光光度計)を用いた濃度測定
- (2) Agilent BioAnalyzer または Tapestation での測定による品質確認

II. シーケンスライブラリの作製及び品質確認

- (1) 品質測定に合格したサンプルについてイルミナ社 Truseq stranded mRNA ライブラリ調整キットを用いてライブラリ調整を行う。
- (2) Agilent BioAnalyzer または Tapestation での測定によるサイズ確認
- (3) Quantitative PCR によるライブラリの定量

III. 次世代シーケンサによるデータ取得

イルミナ社 Novaseq6000 を使用し、下記の要領でシーケンス解析を行うこと。

- (1) 解析方法 : ペアエンド解析
- (2) 検体数 : 96 検体
- (3) データ量 : 約 30 M リード/検体
- (4) 読み取り塩基長 : 100 若しくは 150 塩基 (両鎖解析)/1 リード

IV. データ解析

上記 III. で得られた解析生データについては、下記に挙げる情報処理を実施すること。

- (1) Bcl ファイルを bcl2fastq で Fastq ファイル(Raw data)に変換する。
- (2) 産出された生データの概要を作成する。(総塩基数、リード数、GC(%), Q20(%), Q30(%))
- (3) 発現データ解析
 - 得られたシーケンス情報をもとにサンプル毎に以下の解析を行う。
 - 当センター担当者が提供するクロマツの EST 情報 (遺伝子の塩基配列) に対して、bowtie プログラムでマッピングし、リードのカウントを行う。
 - 遺伝子の発現量カウントのデータをもとに edgeR もしくは DESeq ソフトウェアを用いて、サンプル間の遺伝子発現差を統計処理により得る。統計処理はデータのフィルタリング Log 値への変換、正規化を行う。

4. 納品データ

成果物として、上記IVにより得たデータを HDD に入れて納入する。また、納入にあたっては、書面により、その旨を報告する。

5. 納品場所 国立研究開発法人 森林研究・整備機構
森林総合研究所林木育種センター
茨城県日立市十王町伊師3809-1

6. 納 期 令和3年2月26日

7. その他

- (1) サンプルの送付、解析方法の詳細については、担当者と事前に協議を行い互いに納得した上で業務を行うこと。
- (2) 提供するサンプル及び本業務に際し、得られた情報を無断で使用・公開したり、第三者に提供したりしてはならない。業務終了後も同様とする。
- (3) 本仕様書に定めのない事項に関して疑義が生じた場合は、その都度担当者と協議の上、業務を遂行するものとし、軽微なものについては、その指示に従うこと。

以上